

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 12 November 2018 sampai dengan 28 Desember 2018 di Laboratorium Nutrisi dan Laboratorium Kesehatan Lingkungan, Balai Perikanan Budidaya Air Payau, Situbondo.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan dan Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah:

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Tabel 1. Bahan yang digunakan dalam penelitian

Nama Bahan	Merek	Kegunaan
<b>Pencampuran Pakan Pelet</b>		
Pelet Komersil	STELLA	Media Pakan Butan
Selenium Organik (0,4,8,12 dan 16) mg/kg	Alltech	Sumber Pembeda Kontrol Uji
Air Tawar		Sebagai Media Pelarut Selenium Organik dan Progol
Plastik		Tempat Untuk Menaruh Pakan yang telah di timbang
Progol	BOSTER	Untuk Mencampur Pakan Ikan dengan Multivitamin, Antibiotik atau Feed Supplement lain
Kertas Label		Untuk Memberi Tanda Pada Bahan Uji
<b>Pemeliharaan Hewan Uji</b>		<b>Ukuran</b>
Pellet yang Telah Tercampu Selenium Organik	(0,4,8,12 dan 16) mg/kg	Media Pakan Uji dengan Dosis yang Berbeda
Ikan Kerapu Cantang 100 ekor	Ukuran 8 cm	Hewan Uji
Air Laut Steril		Media
Kertas Label		Penulisan Kode Wadah

## Kertas Laporan 10 Harian

Penulisan Perkembangan 10 Hari  
Hasil Percobaan**Penyuntikan Bakteri**

Bakteri <i>Vibrio vulnificus</i>	10 <sup>7</sup> sel/ml	Sebagai bakteri ujiantang pada hewan uji
S spuit	1 ml	Alat untuk menginjeksi bakteri pada hewan uji
Jarum suntik	26G	Jarum suntik pada spuit
Sarung tangan		Untuk melindungi tangan dari bakteri

**Hematokrit**

Minyak cengkeh		Sebagai Larutan Pembius Hewan Uji (Ikan)
Tabung eppendorf	1 ml	Sebagai Tabung Tempat ditaruhnya Sampel Darah Hewan Uji
Tube EDTa	1 ml	Tempat penampungan darah Penghambat proses pembekuan pada darah
Es batu		Mempercepat proses pembekuan pada darah
Tabung mikropipiler hematokrit		Tempat penampungan darah untuk dilakukannya pengukuran hematokrit
Jarum suntik	26G	Jarum suntik untuk mengambil darah hewan uji
Dempul ( <i>Claw</i> ) tabung mikropipiler		Lilin untuk menyumbat tabung mikropipiler yang sudah terisi darah

**Fagositosis**

Staphylococcus aureus	10 <sup>7</sup> CFU/mL	Bakteri perantara untuk melihat aktivasi sel darah putih
Disposable tips	10 mikro	Ujung mikro pipet
Tube	1 ml	Tempat menampung darah dan bakteri
Objek glass		Tempat ditaruhkannya preparat hewan uji
Metanol	10%	Untuk memfikasi darah agar darah tidak hilang saat dilakukan pewarnaan
Larutan giemsa		Untuk pewarnaan pada preparat hewan uji

### 3.2.2 Alat Penelitian

Tabel 2. Alat yang digunakan dalam penelitian

Nama Alat	Ukuran	Kegunaan
<b>Pencampuran Pakan Pelet</b>		
Timbangan Pakan	5 Kg	Alat Timbang Pakan
Timbangan Analitik	Mg	Alat Timbang Selenium Organik
Baskom		Wadah Saat Pakan Pellet Ditimbang
Sendok Pakan		Alat Pengambil Pakan Pelet Untuk Ditimbang
Nampan Pakan		Alas Ditaruhnya Pakan Pellet Komersil Untuk Dilakukannya Pelapisan ( <i>Edible Coating</i> )
Gelas Ukur		Tempat Untuk Mencampur Selenium+Progol dan Air
Sendok		Untuk Mengaduk Campuran Selenium+Progol dan Air agar Merata
Sarung Tangan		Pelapis Tangan Untuk Mengaduk Adonan Hingga Merata
Cawan Mangkuk		Tempat di Taruhnya Selenium dan Progol
<b>Pemeliharaan Hewan Uji</b>		
Toples	16L	Sebagai Wadah Hewan Uji
Batu Aerasi, Selang Aerasi, dan Aerator	-	Untuk aerasi media tumbuh
Ember	18 liter	Sebagai Wadah Penampungan Juvenil Ikan Kerapu Cantang Saat Pengelompokan dan Proses Ngreding
Selang	Diameter 1 inchi dan 1.5, Panjang 3 m dan 4 m	Sebagai Alat Penyalur Media Oksigen
Selang Sipon	Diameter 4 inchi, Panjang 10 m	Sebagai Alat Untuk Menyipon Kotoran Pada Tempat Media Uji
Pengukur panjang ikan	15 cm	Untuk Mengukur Pertumbuhan Panjang Hewan Uji
Gayung	-	Sebagai Alat Untuk Mengambil Hewan Uji
<b>Pengukuran Kualitas Air</b>		
Termometer	<sup>0</sup> C	Mengukur Suhu Air
pH Meter	pH	Mengukur Ph
Refraktometer	1%	Mengukur Salinitas air
Do Meter	0,00 mg/L	Mengukur Oksigen Terlarut
<b>Penyuntikan Hewan Uji</b>		
Tabung eppendorf	15ml	Tempat ditaruhnya bakteri

<b>Himatokrit</b>		
Sput	1 ml	Alat Untuk Mengambil Darah Hewan Uji
Nampan		Alat Ditaruhnya Hewan Uji Untuk dilakukan Proses pengambilan Darahnya
Hematocrit Centifuge	15.000 rpm	Alat untuk memisahkan antara eritrosit dengan plasma darah
Pembaca hematokrit	Vol %	Alat untuk mengukur hematokrit pada darah hewan uji
<b>Fagositosis</b>		
Mikro pipet	10 ul	Untuk mengambil darah dan bakteri
Gelas metanol		Tempat ditaruhnya preparat untuk dilakukan perendaman pada larutan metanol
Tempat pewarnaan giemsa		Tempat ditaruhnya preparat untuk dilakukan perendaman pada larutan giemsa
Mikroskop		Untuk mengamati aktifitas fagositosis pada darah dengan perbesaran
Alat penghitung fagositosis		Untuk menghitung perbandingan antara sel darah putih yang fagositosis dan tidak fagositosis

### 3.3 Batasan Variable

Adapun batasan variable dalam penelitian ini adalah :

#### 1. Kerapu Cantang

Kerapu Cantang merupakan jenis ikan kerapu hybrid, yaitu hasil persilangan antara kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*). Ikan kerapu Cantang merupakan ikan dermesal yang menyukai hidup di daerah perairan karang diantara celah-celah karang atau didalam gua di dasar perairan. Ikan karnivora yang tergolong kurang aktif ini relative mudah dibudidayakan karena mempunyai adaptasi yang cukup tinggi (Warisenta *et al.*, 2016).

## 2. Selenometionin

Selenometionin adalah bentuk kimia utama dari Se organik dalam pakan, dan dilaporkan mempunyai *bioavailability* lebih tinggi dari pada Se anorganik (sodium selenite) pada *Atlantik salmon* (Bell dan Cowey, 1989) dan *channel catfish* (Wang dan Lovel, 1997).

## 3. Laju Pertumbuhan

Laju pertumbuhan adalah hasil dari perkembangan ikan yang dilakukan proses uji coba untuk mengetahui bobot dan panjang mutlak ikan (*W*), laju pertumbuhan harian (*SGR*), dan rasio konversi pakan (*FCR*).

## 4. Daya Tahan Tubuh Ikan

Daya tahan tubuh merupakan kemampuan dari ikan tersebut untuk melawan dari serangan penyakit atau antibodi, dan juga sebagai pengganti bagian sel yang rusak. Dilakukannya uji tantang dengan bakteri *Vibrio vulnificus*  $10^7$  sel/ml untuk mengetahui imunitas ikan setelah dilakukan proses pemeliharaan dengan pengaruh dosis selenometionin pada pakan.

## 5. Tingkat Kelangsungan Hidup

Kelangsungan hidup atau disebut juga dengan survival rate (*SR*) merupakan persentase ikan uji yang hidup pada akhir pemeliharaan dari jumlah ikan uji yang ditebar pada saat pemeliharaan dalam suatu wadah. Effendie (1979), bahwa tingkat kelangsungan hidup merupakan nilai persentase jumlah ikan yang hidup selama periode pemeliharaan.

### 3.4 Metode Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (*RAL*). *RAL* adalah suatu rancangan dimana perlakuan

dilibatkan sepenuhnya secara acak pada unit-unit eksperimen. Rumus Rancangan Acak Lengkap adalah:

$$Y_{ij} : \mu + \alpha_i + \sum ij$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  : Nilai parameter utama akibat perlakuan ke-i (P1, P2, P3, dan P4) dan ulangan ke-j (U1, U2, dan U3)

$\mu$  : Nilai rata-rata (Nilai tengah)

$\alpha_i$  : Pengaruh Perlakuan ke-i (P1, P2, P3, dan P4)

$\sum ij$  : Pengaruh kesalahan perlakuan akibat perlakuan ke-j

$i$  : Jumlah perlakuan (P1, P2, P3, dan P4)

$j$  : Jumlah ulangan (U1, U2, dan U3)

Percobaan didesain menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan juvenil ikan Kerapu Cantang berasal dari Pembenihan Benur 89, milik Bapak Didik Nursanto, S.Pi di Kec. Kambangsembi, Situbondo, Jawa Timur. Pertumbuhan dan Daya Tahan Tubuh Juvenil Ikan Kerapu Cantang yang Diberi Pakan dengan Penambahan **selenium organik** mengaplikasikan 5 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang diujikan adalah penambahan Se dalam bentuk selenometionin pada berbagai tingkat dosis yaitu tanpa penambahan Se, penambahan 4 mg Se/kg pakan, penambahan 8 mg Se/kg pakan, penambahan 12 mg Se/kg pakan dan penambahan 16 mg Se/kg pakan. Oleh karena itu pertumbuhan dan daya tahan tubuh juvenil ikan kerapu Cantang yang diberi pakan dengan penambahan selenium organik yang dilakukan dalam penelitian ini beserta kontrol adalah :

1. **Perlakuan A tanpa Penambahan Se pada pakan (kontrol).**
2. **Perlakuan B dengan Penambahan 4 mg Se/kg pakan.**

3. **Perlakuan C dengan Penambahan 8 mg Se/kg pakan.**
4. **Perlakuan D dengan Penambahan 12 mg Se/kg pakan.**
5. **Perlakuan E dengan Penambahan 16 mg Se/kg pakan**

**Tata letak wadah penelitian dapat dilihat pada gambar 4.**

<b>B3</b>	<b>C2</b>	<b>D1</b>	<b>E4</b>	<b>A1</b>
<b>C3</b>	<b>D2</b>	<b>E1</b>	<b>A3</b>	<b>B4</b>
<b>A2</b>	<b>C1</b>	<b>E2</b>	<b>D4</b>	<b>B2</b>
<b>E3</b>	<b>A4</b>	<b>C4</b>	<b>B1</b>	<b>D3</b>

Gambar 4. Tata letak wadah penelitian

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Persiapan Media Penelitian**

Dalam penelitian ini menggunakan wadah Toples berukuran volume 16L. Media percobaan adalah air laut yang telah di filtrasi, dengan salinitas 30-35 ppt dan suhu 30-33°C. Toples yang telah terisi air laut yang telah di filtrasi dengan salinitas 30-35 ppt dan suhu 30-33°C akan di beri aerasi sebanyak 1 buah.

#### **3.5.2 Persiapan Hewan Uji**

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Juvenil ikan kerapu Cantang berasal dari Pembenihan Benur 89, milik bapak Didik Nursanto, S.Pi, Kembangsambi, Situbondo, Jawa Timur.

Persiapan hewan uji meliputi sampling ikan sebanyak 100 ekor dengan panjang 8cm dan pemuasan ikan terlebih dahulu selama 12 jam pada bak tandon penampungan. Setelah dilakukan pemuasaan pada hewan uji baru dilakukan pemeliharaan pada media penelitian, dengan 5 ekor juvenil ikan kerapu cantang pada setiap media penelitian.

### 3.5.3 Persiapan Pakan Ikan

Dalam penelitian kali ini menggunakan pakan pelet yang akan di beri campuran Selenometionin dengan dosis yang berbeda pada per kg pakan pelet dengan metode *Edible Coating*. Pakan pelet sendiri merupakan pakan pelet komersil dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau, Situbondo, Jawa Timur. Sebelum pakan diberikan pada hewan uji akan dilakukan proses pencampuran pakan pelet komersil dengan selenometionin.

Adapun cara pencampuran pakan pelet dengan selenometionin adalah dengan menimbang selenium organik dengan dosis yang berbeda per Kg pakan menggunakan timbangan analitik, menimbang Progol sebanyak 5g/Kg pakan dan ditaruh pada cawan mangkuk untuk dicampurkan bersama selenium organik dengan dosis yang berbeda-beda. Setelah progol tercampur merata dengan selenium organik maka ditaruhlah pada gelas ukur untuk ditambahkan air sebanyak 25 ml kemudian diaduk hingga larut. Menyiapkan pakan pellet komersil sebanyak 1 Kg pada wadah baskom 20L, melakukan peroses *Coating* atau pelapisan dengan cara menyemperotkan campuran selenium organik dan Progol cair pada pakan pelet komersil pada baskom dan aduk hingga merata. Setelah tercampur rata maka dilakukan penirisan pada nampan untuk dilakukan proses pengeringan dengan cara mengangin-anginkan pada tempat yang sejuk. Setelah pakan kering baru dilakukan penimbangan dan pengemasan.

### 3.5.4 Pemberian Pakan dan Penyiponan

Selama pemeliharaan, ikan diberi pakan dengan menggunakan 10% dari biomassa (bobot tubuh) ikan. Frekwensi pemberian pakan adalah sebanyak 2 kali sehari (pukul 08.00 dan 16.00). Metode pemberian pakan dalam penelitian dapat dilihat pada persamaan berikut.



$$\text{Pakan ikan (Gram)} = \text{Total BM setiap toples (gr)} \times 10\%$$

Setelah dilakukan pemberian pakan untuk menjaga kelayakan media budidaya dilakukan proses penyiponan untuk mengangkat sisa makanan pada media penelitian.

### 3.5.5 Uji Tantang

Untuk mengetahui pengaruh selenium terhadap daya tahan tubuh (imunitas) ikan cantang maka dilakukan uji tantang dengan bakteri *Vibrio vulnificus* dengan dosis  $10^7$  sel/ml. Setelah dilakukan proses uji pertumbuhan selama 30 hari setiap ikan pada semua perlakuan akan di injeksi dengan ferkuensi 0,1 ml bakteri *V. Vulnificus*  $10^7$  sel/ml dan akan diamati perkembangannya selama 10 hari.

## 3.6 Parameter Pengamatan

### 3.6.1 Parameter Utama

#### 1. Pertumbuhan

Pengamatan pertumbuhan pada juvenil Ikan Kerapu Cantang akan dilakukan setiap 10 hari. Pengamatan pertumbuhan meliputi bobot mutlak ikan 10 hari ( $W$ ), laju pertumbuhan harian ( $SGR$ ), rasio konversi pakan ( $FCR$ ). Ikan dihitung panjangnya dengan penggaris dan menghitung bobot ikan menggunakan timbangan analitik. Sebelum dilakukan pengamatan pertumbuhan ikan tidak diberi makan sebelumnya.

Menurut Filnly Dwi Arisanti, dkk. 2013 rumus penghitungan pertumbuhan biomasa selama pemeliharaan menggunakan :

$$W = W_t - W_o$$

Keterangan :  $W_t$  = Bobot akhir pada ikan uji

$W_o$  = Bobot awal pada ikan uji

Menurut Ayuniar dkk. 2015, rumus untuk menghitung laju pertumbuhan berat harian menggunakan :

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_o}{T} \times 100\%$$

Keterangan : SGR = Laju pertumbuhan spesifik (%/hari)

W<sub>t</sub> = Bobot biomasa ikan uji pada akhir penelitian (g).

W<sub>o</sub> = Bobot biomasa ikan uji pada awal penelitian (g).

T = Lama waktu pemeliharaan (hari)

Menurut Ayuniar dkk. 2015, rumus untuk menghitung Nilai Rasio konversi pakan (FCR) :

$$FCR = \{F/(W_t + D) - W_o\}$$

Keterangan : FCR = Rasio konversi pakan.

F = Jumlah pakan yang diberikan (gram).

W<sub>t</sub> = Bobot biomassa ikan pada waktu t (gram).

W<sub>o</sub> = Bobot biomassa ikan pada awal pemeliharaan (gram).

D = Bobot biomassa ikan yang mati selama pemeliharaan (gram).

## 2. Daya Tahan Tubuh

Pada pengamatan daya tahan tubuh juvenil Ikan Kerapu Cantang yang diberi pakan dengan penambahan Selenometionin dilakukan uji tantang dengan bakteri *Vibrio vulnificus* 10<sup>7</sup> sel/mL dengan pengamatan Hematokrit dan aktifitas Fagositosis yang juga dilakukan pada akhir percobaan dengan cara :

### a) Hematokrit

Proses pengukuran hematokrit dilakukan dengan pengambilan darah ikan kerapu cantang menggunakan spuit 1 ml yang sudah di olesi EDTa sebagai anti koagulan. Darah ikan diambil sebanyak 0,1 ml per toples perlakuan dan di taruh pada tabung ependoft untuk didinginkan. Pengambilan darah dengan tabung hematokrit mikro kapiller sebanyak 2/3 volume tabung. Salah satu ujung tabung

ditutup dengan dempul (clay) lalu disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 15.000 rpm. Penghitungan hematokrit diukur dengan alat pembaca hematokrit.

#### **b) Aktivitas Fagositosis**

Proses penghitungan aktivitas fagositosis sel darah putih dilakukan setelah proses penghitungan hematokrit dengan cara pematangan tabung hematokrit mikro kapiler pada sel darah putih (batas antara plasma darah dan sel darah merah). Pengambilan sel darah putih dengan mikropipet sebanyak 10 mikro dan ditaruh pada tabung eppendorf. Pengambilan bakteri *Staphylococcus aureus*  $10^7$  dengan mikropipet 10 mikro dan ditaruh pada tabung eppendorf sel darah putih lalu homogenkan  $\pm 30$  menit. Menaruh pada objekglass lalu diulas hingga merata dan diamkan hingga mengering. Melakukan proses pewarnaan dengan merendam pada larutan metanol  $\pm 5$  menit lalu perendaman pada larutan giemsa  $\pm 30$  menit setelah itu bilas dengan air mengalir dan tiriskan hingga kering. Setelah preparat kering dilakukan proses pengamatan menggunakan mikroskop elektron dan dihitung sel darah putih yang melakukan proses fagositosis dan tidak melakukan fagositosis terhadap bakteri.

### **3. Survival Rate**

Pengamatan tingkat kelangsungan hidup pada juvenil Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) akan dilakukan setiap 10 harinya. Adapun untuk menghitung tingkat kelangsungan hidup pada juvenil ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) menurut Filnly Dwi Arisanti, dkk. 2013 menggunakan :

$$\text{SR (\%)} = (\text{Nt} / \text{No}) \times 100\%$$

Keterangan : SR = Tingkat Kelangsungan Hidup (%)

Nt = Jumlah ikan yang hidup pada akhir penelitian

No = Jumlah ikan tebar pada awal penelitian

### **3.6.2 Parameter Penunjang**

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah kualitas air. Pengukuran kualitas air dilakukan setiap hari adalah Salinitas, Oksigen terlarut (DO), Suhu, dan pH.

### **3.7 Analisa Data**

Data yang diperoleh kemudian dilakukan sidik ragam atau analisa varians (ANAVA) untuk menentukan perbedaan pengaruh antarperlakuan dalam penelitian, jika berpengaruh nyata maka dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk menentukan perlakuan yang optimal pada taraf kepercayaan 95 % ( $\alpha=5\%$ ). Selanjutnya untuk membandingkan nilai antar perlakuan hasil dari penelitian diuraikan secara diskriptif.

